



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-053477

(43)Date of publication of application : 22.02.1990

(51)Int.Cl.

C12J 1/04  
C07D487/04  
C12N 1/38

(21)Application number : 63-203809

(71)Applicant : NAKANO VINEGAR CO LTD

(22)Date of filing : 18.08.1988

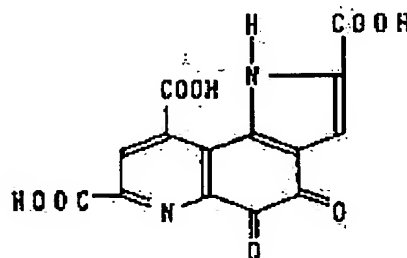
(72)Inventor : AMEYAMA MINORU  
ADACHI KAZUO  
MATSUSHITA KAZUNOBU  
SHINAGAWA EMIKO  
TAKAHARA HIDEAKI

## (54) COMPOSITION FOR PROMOTING ACETIC FERMENTATION AND PRODUCTION OF VINEGAR USING SAME

## (57)Abstract:

PURPOSE: To provide the title composition capable of producing high- concentration vinegar in shorter time, containing, as active ingredients, 4,5- dihydro-4,5-dioxy-1H-pyrrolo[2,3-f]quinoline-2,7,9-tricarboxylic acid (PQQ) and Ca<sup>2+</sup>.

CONSTITUTION: The objective composition containing, as active ingredients, PQQ of the formula and Ca<sup>2+</sup>. This composition is incorporated in a fermentation solution so as to be  $\geq 1\mu\text{g/l}$  of PQQ and  $\geq 3\text{mg/l}$ , on a CaCl<sub>2</sub> basis, of Ca<sup>2+</sup>, each based on said solution. Also, this composition is added to an acetic fermentation medium to make an acetic fermentation to produce vinegar. By using this composition, high ADH (membrane-bound type alcohol dehydrogenase) activity can be retained even in, so to speak, stationary and dying periods where the growth of acetic bacteria has almost been terminated. As a result, high acetic acid productivity in the high concentration range can be maintained; therefore, high- concentration vinegar will be obtained in a shorter time.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision  
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-53477

⑬ Int. Cl.<sup>3</sup>

C 12 J 1/04  
C 07 D 487/04  
C 12 N 1/38

識別記号

1 0 3  
1 4 0

庁内整理番号

6807-4B  
8413-4C  
8515-4B

⑭ 公開 平成2年(1990)2月22日

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全4頁)

⑮ 発明の名称 酢酸発酵促進用組成物およびそれを用いる食酢の製造法

⑯ 特 願 昭63-203809

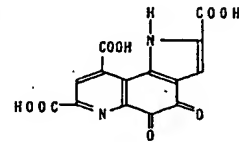
⑰ 出 願 昭63(1988)8月18日

特許法第30条第1項適用 昭和63年3月15日、社団法人日本農芸化学会発行の「日本農芸化学会誌62巻03号」に発表

⑱ 発 明 者	飴 山 實	山口県山口市大字大内御堀44-1
⑱ 発 明 者	足 立 収 生	山口県山口市大字宮野下2034
⑱ 発 明 者	松 下 一 信	山口県山口市大字吉敷2645-27
⑱ 発 明 者	品 川 恵 美 子	山口県山口市中央5丁目12-1
⑱ 発 明 者	高 原 英 明	東京都三鷹市3丁目1-21
⑲ 出 願 人	株式会社中荏酢店	愛知県半田市中村町2丁目6番地
⑲ 代 理 人	弁理士 久保田 藤郎	

明 細 書

一般式



1. 発明の名称

酢酸発酵促進用組成物およびそれを用いる  
食酢の製造法

2. 特許請求の範囲

(1) 4,5-ジヒドロ-4,5-ジオキソ-1H-ピロ  
ロ[2,3-f]キノリン-2,7,9-トリカルボン  
酸およびカルシウムイオンを有効成分とする酢酸  
発酵促進用組成物。

(2) 酢酸発酵を行うにあたり、4,5-ジヒドロ  
-4,5-ジオキソ-1H-ピロロ[2,3-f]キノ  
リン-2,7,9-トリカルボン酸およびカルシウム  
イオンを有効成分とする組成物を添加することを  
特徴とする食酢の製造法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は酢酸発酵促進用組成物およびそれを用  
いる食酢の製造法に関し、さらに詳しくは

で表わされる4,5-ジヒドロ-4,5-ジオキソ-  
1H-ピロロ[2,3-f]キノリン-2,7,9-トリ  
カルボン酸(以下、PQQと略す。)およびカル  
シウムイオンを有効成分とする酢酸発酵促進用組  
成物および酢酸発酵培地に該組成物を添加して酢  
酸発酵を行うことを特徴とする食酢の製造法に関  
する。

〔従来の技術及び発明が解決しようとする課題〕

酢酸菌による酢酸発酵は、食酢製造上の最も重  
要なプロセスであるが、これは酢酸菌を生育させ  
て酢酸菌の有する膜結合型アルコール脱水素酵素  
(以下、ADHと略す。)および膜結合型アルデ  
ヒド脱水素酵素(以下、ALDHと略す。)の共  
同作用によりエタノールが酢酸にまで変換される  
ことを利用するものである。特に、ADHの活性

は酢酸発酵速度と非常に高い正の相関があることも示されている。酢酸発酵は、その発酵経過から(1)菌体増殖期および(2)菌体増殖の停止期の二つの段階に分けられ、このどちらの時期においても酢酸発酵は進行する。しかしながら、菌体増殖の停止期では新たな菌体が生じないために酵素活性の低下が起こり、その結果発酵後期の生産性が低下することになる。特に、高濃度の食酢を製造する場合には、酵素活性、特にADH活性の低下が著しく、菌体増殖停止期、いわゆる菌体増殖の定常期および死滅期において酵素活性を何らかの技術でより高く維持することが食酢の製造期間の短縮のために必要である。

#### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、前記した従来技術の課題を解決すべく鋭意研究を進めた結果、酢酸菌の培養後期、特に定常期および死滅期において酢酸発酵に直接関与するADHがアボ化(酵素と補酵素が解離する現象)を起こし、その結果酵素活性を示さなくなることを見出すと同時に、ADHのホロ化

(酵素と補酵素の結合)にはPQQおよびカルシウムイオンの共存が必須であることを明らかにし、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は4,5-ジヒドロ-4,5-ジオキソ-1H-ピロロ[2,3-f]キノリン-1,7,9-トリカルボン酸およびカルシウムイオンを有効成分とする酢酸発酵促進用組成物を提供するとともに、酢酸発酵を行うにあたり、該組成物を添加することを取敢とする食酢の製造法をも提供するものである。

本発明者らは、特開昭61-58584号公報においてPQQを培地に添加して酢酸菌を培養することにより、ADH、ALDHおよび酢酸の生産に要する時間を短縮できることを明らかにした。しかし、これは酢酸菌の培養において誘導期を著しく短縮したことに起因しているものであって、本発明におけるADHおよびALDHの酵素活性の向上、活性の低下抑制、酢酸生成速度の向上、最終到達濃度の向上等の効果は全く認められず、これらを示唆する記載もない。本発明における有用性

は、発酵後期において低下するADHの活性をより高く維持することに起因しており、またその効果も酢酸生成速度の向上であるから、前記の発明(特開昭61-58584号公報)とは本質的に異なる。さらに、本発明はPQQおよびカルシウムイオンを併用した時にのみ上記効果が現われ、PQQ単独では上記の効果は現われないことから前記の発明とは明らかに相違するものである(後記実験例参照)。

本発明の酢酸発酵促進用組成物はPQQおよびカルシウムイオンを有効成分とする。本発明に用いるPQQは、特に純品である必要はなく、酵母エキス、肉エキス、コーン・スティーブ・リカーなどの天然物あるいはその抽出物などPQQを含むしているものでもよい。また、カルシウムイオンは各種カルシウム塩である必要はなく、カルシウムを含有する天然物あるいはエキスなど発酵液中でイオン化するものであればよい。本発明の酢酸発酵促進用組成物は、発酵溶液に対してPQQを1 $\mu$ g/l以上、好ましくは0.1~10mg/l、カルシ

ウムイオンを塩化カルシウムとして3mg/l以上、好ましくは0.2g/l~1g/l含有する。

本発明では、上記組成物を酢酸発酵培地に添加して酢酸発酵を行ない食酢を製造する。上記組成物を酢酸発酵培地に添加する時期は、特に制限がなく、あらかじめ培地に添加してもよく、あるいは流加液に添加してもよく、また発酵中に直接発酵液に添加してもよい。本発明の食酢の製造法は、上記組成物を酢酸発酵培地に添加すること以外は、通常の酢酸発酵による食酢の製造法と同様に行えばよい。言いかえれば、通常の酢酸発酵条件下で上記組成物は有効に作用する。

#### 【実施例】

次に実験例および実施例により本発明を説明する。

#### 実験例1

グルコース0.5% (w/v)、グルコン酸ソーダ2.0% (w/v)、グリセロール0.3% (v/v)、酵母エキス0.3% (w/v) およびポリペプトン0.2% (w/v) から成る液体培地100mlを500ml容坂口フ

ラスコに入れ、120℃で15分間加熱滅菌した。これに別途生育させておいたグルコノバクター・サブオキシダンスIFO 12528を接種し、30℃で往復振とう培養を行った。対数増殖期を過ぎ定常期に入りつつある37時間後に菌体を集めて洗浄後、完全にフレンチプレスで破砕して無細胞抽出液を得た。

得られた無細胞抽出液にPQQ 4  $\mu\text{mol/l}$  およびカルシウムイオン、マグネシウムイオン、コバルトイオン、ニッケルイオンあるいはマンガンイオンを所定濃度添加し、ADH活性値の変化を調べた。この結果を第1図に示す。

第1図より明らかなように、ADHのホロ化による活性の上昇は、カルシウムイオンにのみ特異的に認められることがわかった。

#### 実験例2

実験例1と同様の方法で無細胞抽出液を準備し、無細胞抽出液のみを25℃で10分間放置した場合と、無細胞抽出液にPQQ 1  $\text{mg/l}$  および塩化カルシウム 0.5  $\text{g/l}$  を添加して25℃で10分間放置した

間後、21時間後、37時間後、48時間後および60時間後に菌体を集め、破砕後遠心分離により膜成分(第3図棒グラフ左側)と細胞質成分(第3図棒グラフ右側)とに分画し、何も添加しない場合とPQQおよびカルシウムイオンを添加した場合についてそれぞれ酵素活性を測定した。この結果を第3図に示す。なお、何も添加しない場合の酵素活性は白棒で示し、PQQおよびカルシウムイオンを添加した場合の酵素活性増加分は黒棒で示した。

第3図から明らかなように、培養後期においてPQQおよびカルシウムイオンの添加により、ADH活性が2~2.5倍に増大した。

以上の実験例1~3の結果から明らかなように、本発明の組成物を用いることによってADH活性の活性化が可能であることが判明した。

#### 実施例1

グルコース 0.5 % (w/v) , 酵母エキス 0.05 % (w/v) , エタノール 6.5 % (v/v) および酢酸 6.5 % (w/v) から成る培地 3  $\text{L}$  を 5  $\text{L}$  容の通気発

### 特開平2-53477(3)

場合についてそれぞれADH活性を測定した。この結果を第1表に示す。

第1表

	PQQ および 塩化カルシウム 無添加	PQQ および 塩化カルシウム 添加
ADH 活性 (単位/100 $\text{mg}$ 培養液)	30	80

第1表に示すように、PQQおよび塩化カルシウムを添加することにより著しいADH活性の増大が見られた。

また、上記した無細胞抽出液にPQQおよび塩化カルシウムを添加したものを37℃、25℃および5℃で20分間放置した。この結果を第2図に示す。

第2図より明らかなように、通常の酢酸菌の培養温度(25~37℃)で本発明の組成物は有効に作用することがわかった。

#### 実験例3

通常の方法で酢酸発酵を行い、9時間後、14時

酵装置に注入し、これに上記と同一培地 300  $\text{ml}$  で培養したアセトバクター・アルトアセチゲネス MH-24 (FERM BP-491) の培養液を接種し、30℃、0.1vvmの通気量で通気攪拌を行い発酵を開始した。酢酸濃度が11.5% (w/v) となった時点でエタノールを供給し、液中のエタノール濃度が2%前後を維持する様に制御し、食酢を製造した。一方、培地に0.001%のPQQおよび0.1%の塩化カルシウムを加えたこと以外は、上記と同様にして発酵を行い食酢を製造し、成績を比較した。なお、発酵は酢酸濃度が15% (w/v) を超えた時点で終了とした。この結果を第2表に示す。

第2表

	酢酸濃度12~ 15%における 最大生酸速度 (%/hr)	酢酸濃度12% から15%まで の所要時間 (hr)
PQQ, 塩化カルシウム 無添加	0.20	18
PQQ, 塩化カルシウム 添加	0.26	12

(4)

特開平2-53477(4)

第2表から明らかなように、PQQおよびカルシウムイオンを添加したものは酢酸発酵速度が促進されるので、高濃度食酢を短時間で製造することができる。なお、本実施例により得られた食酢は特に異味、異臭の全くない良好な品質の食酢であることが官能検査の結果確認され、両者で有意な差は認められなかった。

#### 〔発明の効果〕

本発明の組成物を用いることにより、酢酸菌体の増殖がほぼ停止した、いわゆる定常期および死滅期においても高いADH活性を維持することが可能となり、その結果高酸度域での高い酢酸生産性を維持できるため、高濃度食酢を従来よりも短時間で生産することができる。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は実験例1において無細胞抽出液にPQQと各種金属イオンを添加した場合のADH活性化に対する影響を示すグラフ、第2図は実験例2において無細胞抽出液にPQQと塩化カルシウムを添加したものを培養した場合の温度と

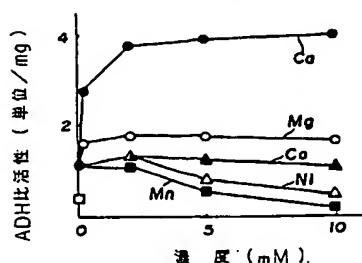
ADH活性化の関係を示すグラフ、第3図a、bは実験例3における酢酸発酵中の酵素活性の変化を示すグラフである。

特許出願人 株式会社 中 塾 酢 店

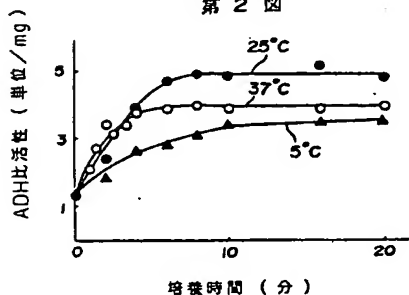
代 理 人 弁 理 士 久 保 田 藤 郎



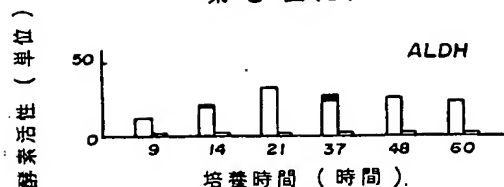
第1図



第2図



第3図(a)



第3図(b)

